

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 24520081153424

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

兔肺静脉肌袖心肌细胞动作电位及  
TRPC3 类通道电流特性

Characteristics of the action potentials and the channel  
similar to TRPC3 in the cardiomyocytes from rabbit  
pulmonary vein sleeves

戴增欢

指导教师姓名: 黄卫斌 副教授

专 业 名 称: 内科学

论文提交日期: 2011 年 4 月

论文答辩时间: 2011 年 6 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2011 年 6 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( 导师黄卫斌等 )课题(组)的研究成果,获得( 厦门市卫生局及厦门大学附属中山医院心内科 )课题(组)经费或实验室的资助,在( 厦门大学附属中山医院心内科电生理 )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

2011 年 4 月 20 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（ ☒ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

2011 年 4 月 20 日

## 摘 要

**目的** 兔心房和肺静脉上的非选择性阳离子通道与 TRPC3 非常相似,本实验通过对兔肺静脉肌袖心肌细胞(PVC)和心房肌细胞(LAC)动作电位及 TRPC3 类通道电流特性的研究,进一步探讨 TRPC3 类通道在早后除极(EAD)中的作用及起源于肺静脉的阵发性房颤的电生理机制。

**方法** 采用全细胞膜片钳技术分别记录 PVC 和 LAC 的动作电位及非特异性阳离子流,同时加用胰岛素,观察胰岛素对动作电位及电流的影响。

**结果** PVC 动作电位时程较 LAC 的明显延长,并可以诱发第二平台反应,加用胰岛素后 PVC 和 LAC 动作电位时程均明显缩短。通过加用  $GdCl_3$ ,我们在 PVC 和 LAC 上可记录到非选择性阳离子流,且 PVC 的电流密度较 LAC 的小;而如果我们加用胰岛素,PVC 和 LAC 的电流密度均增加,且 PVC 的电流密度较 LAC 增加的少。

**结论** PVC 较 LAC 的动作电位时程(APD)明显延长,表明其具有产生 EAD 的明显倾向,进而可能导致快速性心律失常的发生,胰岛素可明显的缩短动作电位时程。PVC 的电流密度较 LAC 的明显减小,PVC 和 LAC 存在的复极离子流的差异构成了两者动作电位差异的基础;胰岛素可使电流密度增加,可初步判定 PVC 和 LAC 上存在的 TRPC3 类通道为 TRPC3。

**关键词** 肺静脉肌袖心肌细胞;胰岛素;非选择性阳离子流;TRPC3

## Abstract

**Objective** The nonselective cation current in cardiomyocytes from rabbit pulmonary vein sleeves (PVC) and left atrial cardiomyocytes (LAC) is similar to the channel of canonical transient receptor potential 3 (TRPC3). In this research, we explored the characteristics of the action potentials and the TRPC3-like channels in the cardiomyocytes from rabbit PVC and LAC to investigate the role that the TRPC3-like channels play in early after depolarization (EAD) and the ionic mechanism of the Paroxysmal atrial fibrillation originated from the pulmonary vein sleeves.

**Methods** The whole-cell patch clamp technique was used to test action potential and ionic currents in both PVC and LAC. Then insulin was added into the bath solution to record the effect on the action potentials and ionic currents in both PVC and LAC.

**Results** The average of action potential duration in PVC was bigger than that in LAC, and the action potential in PVC could be induced the second plateau response easily. In addition, application of insulin can decrease the action potential durations (APDs) of both PVC and LAC. The current density of nonselective cation channel in PVC was smaller than that in LAC, besides the current densities in PVC was significantly less than that in LAC, after adding insulin the current densities were increased in both PVC and LAC. Insulin increased the current densities of nonselective cation channel in both PVC and LAC and the promotion effect was more obvious in LAC.

**Conclusion** The longer action potential duration and the second plateau response in PVC, suggested a strong tendency of EAD generation and furthermore the development of rapid arrhythmias in PVC. The APDs were significantly decreased by adding insulin in both PVC and LAC. The current densities in PVC were significantly less than that in LAC. The difference in repolarizing ionic currents between PVC and

LAC constitutes the basis of the difference in their action potential configuration; the current densities in PVC and LAC can be increased by insulin suggests the TRPC3-like channel existed in the PVC and LAC might be TRPC3.

**Key words** cardiomyocytes ; pulmonary vein muscle sleeves; insulin; nonselective cation current; TRPC3

厦门大学博硕士论文摘要库

## 主要符号

AF	atrial fibrillation	心房颤动
TRP	transient receptor potential	瞬时受体电位
TRPC	the canonical receptor potential	瞬时受体电位传统型
PVC	pulmonary vein sleeves cardiomyocytes	肺静脉肌袖心肌细胞
LAC	left atrial cardiomyocytes	左房心肌细胞
EAD	early after depolarization	早后除极
DAD	delayed after depolarization	迟后除极
AP	action potential	动作电位
APD	action potential duration	动作电位时程
DAG	diacylglycerol	二酯酰甘油
IP3	1, 4, 5-triphosphate	三磷酸肌醇
NSCC	nonselective cation channel	非选择性阳离子通道
PLC	phospholipase c	磷脂酶 c
SRE	serum responsive element	血清应答因素

## 目 录

中文摘要 .....	I
英文摘要 .....	II
主 要 符 号 .....	IV
第一章 前言 .....	1
第二章 材 料 与 方 法 .....	7
2.1 实验动物 .....	7
2.2 主要实验药品 .....	7
2.3 主要仪器、软件 .....	7
2.4 液体配制 .....	9
2.4.1 液体配方 .....	9
2.4.2 配制方法 .....	10
2.5 兔心肌细胞的分离 .....	10
2.5.1 兔心房与肺静脉的大体解剖 .....	10
2.5.2 兔肺静脉肌袖心肌细胞的分离 .....	11
2.5.3 兔心房肌细胞的分离 .....	11
2.6 膜片钳技术 .....	12
2.7 电生理学记录及分析软件 .....	13
2.8 观察胰岛素对动作电位的影响 .....	14
2.9 观察胰岛素对通道电流的影响 .....	14
2.10 统计学处理 .....	14
第三章 结 果 .....	15
3.1 PVC 和 LAC 的动作电位的特性 .....	15
3.1.1 LAC 的动作电位的特性 .....	15
3.1.2 PVC 的动作电位的特性 .....	16



3.1.3 LAC 与 PVC 的动作电位的比较·····	16
3.2 PVC 和 LAC 的非选择性阳离子流·····	16
3.2.1 LAC 的非选择性阳离子流·····	16
3.2.2 PVC 的非选择性阳离子流·····	17
3.2.3 LAC 与 PVC 的非选择性阳离子流的比较·····	17
3.2.4 胰岛素对 LAC 和 PVC 的非选择性阳离子流的影响·····	17
<b>第四章 讨 论·····</b>	<b>19</b>
4.1 TRPC 家族及其与心律失常的关系·····	20
4.2 TRPC3 通道与 EAD·····	22
4.3 局限性·····	23
<b>结 论·····</b>	<b>24</b>
<b>附 图·····</b>	<b>25</b>
<b>参考文献·····</b>	<b>32</b>
<b>综 述·····</b>	<b>36</b>
<b>致 谢·····</b>	<b>49</b>

## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>II</b>
<b>Glossary</b> .....	<b>IV</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapter 2 Materials and Methods</b> .....	<b>7</b>
<b>Chapter 3 Results</b> .....	<b>15</b>
<b>Chapter 4 Discussion</b> .....	<b>19</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>24</b>
<b>Appendix</b> .....	<b>25</b>
<b>Reference</b> .....	<b>32</b>
<b>Review</b> .....	<b>36</b>
<b>Acknowledgement</b> .....	<b>49</b>

## 第一章 前言

近年来关于心房颤动的电生理机制和临床研究的研究是世界范围内临床心脏电生理学家的高度关注的课题，心房颤动(以下简称房颤，atrial fibrillation AF)是目前临床上最常见的心律失常之一，房颤是心肌丧失了正常有规律的舒缩活动，而代之以快速而不协调的微弱蠕动，致使心房失去了正常的有效收缩，房颤持续三周以上为持续性房颤。房颤按时间划分，房颤分为急性房颤和慢性房颤，慢性房颤又分为阵发性、持续性和永久性房颤。阵发性房颤通常小于7天(大多小于24小时)，可自行复律。持续性房颤大于7天，不能自行终止，可药物或电复律，也可复发。持久性房颤大于1年，难以复律或复律后难以维持窦性。目前国外流行病学资料报道的房颤患病率说法并不一致，Framingham研究得出的患病率约为2.1%，发病率约为0.5%，并且房颤的发病率与年龄相关，随着年龄的增长而明显升高。虽然房颤本身并不是致命性的心律失常，但是房颤使心房内血流速度缓慢，房室同步功能丧失，能够引起很多的临床症状，典型的包括心悸、胸闷，其中最严重的并发症是房颤能够导致血栓栓塞，血液在心房内淤滞而形成血栓，血栓脱落可随着血液至全身各处，可引起肾、肝、肠血管动脉等栓塞，更严重且常见的是导致脑栓塞(即中风，偏瘫)、肢体动脉栓塞(严重者甚至需要截肢)。此外房颤还与心力衰竭、病态窦房结综合征等疾病密切相关，症状较轻时可能仅仅是影响生活质量，但严重时会导致残甚至致死，对人体健康的危害极大。房颤症状轻重受心室率快慢的影响，心室率超过150次/分，患者可发生心绞痛与充血性心力衰竭。心室率不快时，患者可无症状。房颤时心房有效收缩消失，心排血量比窦性心律时减少达25%或更多。房颤是脑卒中和心衰最强烈的独立危险因素，20%的脑卒中事件与房颤有关，近30%的心衰是由房颤引起的。

房颤治疗的目的主要是：1、恢复窦性心律：是房颤治疗的最佳方法，只有恢复窦性心律，才能达到完全治疗房颤的目的，所以对任何房颤病人都应该尝试恢复窦性心律的治疗方法。2、控制快速心室率：对于不能恢复窦性心律的房颤病人，可以应用药物降低较快的心室率。3、防止血栓形成和中风：在房颤时，如果不能恢复窦性心律，可以应用抗凝药物治疗以预防血栓形成和中风的发生。

传统的治疗方法有很多,药物治疗对于房颤而言,其成功率低,副作用明显,其窦性心律的维持更以致心律失常甚至是死亡率增加为代价,外科手术治疗的效果也并不能够完全的令人满意。近年来,随着我们对房颤机制研究的深入,经导管射频消融治疗房颤目前成为临床心电生理领域内的一个研究热点,究其原因是射频消融可根治房颤,能够使部分房颤患者从中获益。2006年ACC/AHA/ESC房颤指南中建议对于年龄<75岁、无或有轻度器质性心脏病、左房内径<50mm的反复发作症状严重且药物控制不满意的阵发性房颤患者,在有经验的的心脏电生理中心里,导管消融可作为一线治疗,对其他房颤患者则仍作为二线治疗。2006年,Oral在《新英格兰医学杂志》上发表过的一篇随机对照研究,使房颤导管消融的适应症超越了阵发性房颤,证明了慢性房颤导管消融的有效性。这些都确立了导管消融在房颤治疗中的重要地位,而环肺静脉线性消融是目前房颤经导管消融治疗的主流策略。

起源于肺静脉的阵发性房颤是目前备受世界临床心脏电生理界关注的前瞻性课题, Haissaguerre等<sup>[1]</sup>的研究证实起源于肺静脉内的局灶电活动能够引起房颤的发生,肺静脉肌袖是阵发性房颤起源最主要的部分,肺静脉肌袖和左房后壁为房颤发生和维持最主要的部分,经导管电学隔离肺静脉或者消融肺静脉局灶可以根治房颤。<sup>[2,3]</sup>因此肺静脉肌袖心肌细胞的电生理特性的研究有助于临床对房颤的治疗。然而目前对肺静脉肌袖的电生理学研究主要集中在狗肺静脉肌袖心肌细胞的观察,而且已有的研究结论并不一致。而目前的研究显示家兔心房在某些方面更接近人的心房,例如人的心房肌具有非选择性阳离子流<sup>[4]</sup>,而狗的心房肌是缺如的,所以本实验的研究对象选择了兔的心脏。此外,2001年,Bode等人研究发现非选择性阳离子通道的特异性阻断剂狼蛛毒能够在兔的心房上抑制因急性牵张反应而导致的房颤,该研究也同时证实了非选择性阳离子通道在心律失常的发生中所发挥的重要作用<sup>[5]</sup>。目前国内外的学者们已经在多种心肌细胞上已经发现了数种非选择性阳离子通道电流,国内丁怀玉等人在兔心房和肺静脉肌袖心肌细胞上证实存在非选择性阳离子通道电流<sup>[6]</sup>,但未对通道进行进一步的研究,他们所发现的兔心房和肺静脉上的非选择性阳离子通道与TRPC3非常相似。

肺静脉肌袖是存在于肺静脉中膜的条纹状肌肉组织,是心肌组织呈类似套袖样从左心房延伸到肺静脉所形成,但是肺静脉肌袖心肌细胞与左心房心肌细胞的

电生理特性有很大不同。过去由于人们对肺静脉肌袖心肌细胞的自发节律活动认识较多,所以目前的大多数关于肺静脉肌袖的电生理特性的研究工作是关注自发活动的起搏机制。然而,肺静脉肌袖心肌细胞还有明显的触发性活动,却几乎没有得到应有的重视和研究。而这种活动的发生对房颤的发生更有意义。

心电图是整个心脏在心动周期中所形成的电学活动的综合图形。常规体表心电图中的P波,是由整个心房肌的兴奋所形成的,而QRS综合波和T波,则是由整个心室肌的兴奋和恢复所导致的。简单概括起来,P波与心房肌的动作电位密切相关,是由兴奋波(无数动作电位)在整个心房中扩布的结果。同样,QRS-T波则是由兴奋波在心室肌中扩布和恢复而形成的。因此,归根结底,P波和QRS-T波是由动作电位构成。但由于在整个心脏上,心肌细胞的分布排列的非常复杂,因此,兴奋的传播也相应的复杂,故心房波和心室波都不能简单的等同于动作电位。

在心律失常的发生机制中,折返是最常见的。而折返产生异常冲动的原因则大多数是源于传导的异常,这可能与膜及离子通道,特别是间隙连接的活动异常有很大的关系。然而,直接由于离子通道活动异常中的触发活动导致的心律失常在临床却是最为明显的,机制目前也比较清楚。心肌细胞的触发性活动是冲动发生的异常的一种,它是由动作电位所触发而形成的。因此,触发活动的前提是存在一个去极化电位,否则触发活动是不会发生的。

早后除极是在一个动作电位尚未完全复极时,也就是在动作电位的平台期,又出现了新的去极化波。由于早后除极波可以传播,因而能够导致快速心律失常的发生。EAD发生的前提是不同原因所致心肌细胞复极过程显著延长。而早后除极的诱发因素是多种多样的,性质也不尽相同,例如缺氧、低温、普鲁卡因胺、高浓度儿茶酚胺药物作用以及浦肯耶纤维机械或牵拉性损伤等都可能引起EAD的发生。目前,早后除极的离子机制的研究已经比较明确了,凡是那些能够延长动作电位时程的因素,包括了外向电流的抑制及(或)内向电流的增强都可能会引起早后除极(EAD)的发生。肺静脉肌袖心肌细胞(PVC)的动作电位具有较长的平台期,动作电位的时程较左房心肌细胞(LAC)的明显延长,特别是研究显示肺静脉肌袖心肌细胞(PVC)具有第二平台反应,这一特性就显示出其具有非常强烈的EAD的发生倾向<sup>[6]</sup>。因此,如果机体某些生理条件发生改变,如体内神经、

体液调节功能发生改变时,就可能会导致早后除极的发生,进而可以导致快速性心律失常的发生。

1995年William J. Crumb曾经在人的心房肌细胞上发现过一种非特异性阳离子流<sup>[6]</sup>,而且通过研究发现该非特异性阳离子流对复极有重要的作用。TRP通道是非选择性阳离子通道(nonselective cation channel NSCC),在心肌细胞上研究的比较晚,而在神经细胞、平滑肌细胞,特别是非可兴奋细胞上,相关的研究却比较多。这类通道,对各种阳离子(包括 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Li}^+$ 、 $\text{Cs}^+$ )都可以通过,不过离子通道对各种阳离子的通透性都是不同的。非选择性阳离子通道家族的离子流特点,就是由它们对不同离子的通透性决定的。如果离子通道对钠离子或钙离子的通透性大于对钾离子的通透性,则该电流就是内向电流;如果离子通道对钾离子的通透性大于对钠离子或钙离子的通透性,则该电流就是外向离子流。瞬时感受器电位家族的最初成员是在黑腹果蝇视觉系统中发现的,在果蝇中TRP通过钙的传导参与视觉传导(但是,突变体果蝇对持续的光刺激只产生瞬时而非持续的锋电位)<sup>[7]</sup>。每一个TRP亚单位都是由6个跨膜螺旋组成,其中S5和S6是形成孔道结构,但是其S4不是电压敏感器,离子通道的结构与电压依赖的 $\text{K}^+$ 通道非常类似。这些跨膜螺旋以同源或异源四聚体的方式汇合最终形成了非选择性阳离子通道<sup>[8-10]</sup>。根据跨膜螺旋氨基酸序列的不同,TRP通道家族分为7个亚家族:TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, TRPP, TRPML和TRPN。加上最初在果蝇上报道的13个成员,除了TRPN外,在哺乳动物总共发现28个TRP家族的成员。TRP通道的人类同源物 TRPC(the canonical transient receptor potential)与快速性心律失常的关系最密切,canonical也就是传统型,表示这个家族和原型的果蝇TRP通道的同源性是比较高的。

TRPC 家族都有共同的序列 EWKFAR,并且在第4跨膜区电压敏感器都是缺乏的,包括TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7, TRPC4/5等亚家族。这些通道在已知激活不同的磷脂酶C(PLC)亚型的受体被刺激后就可以被激活,并且能够被钙调蛋白调节,可能同时有几个蛋白能够结合 $\text{Ca}^{2+}$ <sup>[11]</sup>。TRPC通道的激活形式目前发现的有两种,包括了钙库操纵性(store-operated calcium entry, SOCE)和受体操纵性(receptor-operated calcium entry, ROCE)<sup>[12]</sup>。TRPC通道激活依赖的是磷脂酶c(PLC)通路,具体的是:G蛋白偶联的受体(GPCRs)或受体酪氨酸激酶

(TRKs)分别通过激活了磷脂酶 C (PLC)  $\beta$  和  $\gamma$  来继发激活 TRP 通道。PLC 能够水解 4, 5-二磷酸磷脂肌醇(PIP2), 然后可以生成肌醇三磷酸(IP3)和甘油二酯(DAG), 肌醇三磷酸(IP3)水平的升高, 使得细胞内的钙库得以释放, 而细胞内钙库的清空使得 TRPC 通道开放从而引发了胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 内流, 钙库得以重新充盈, 这种钙离子内流的方式被称为钙库操纵性  $\text{Ca}^{2+}$ 内流(SOCE)<sup>[13,14]</sup>。此外, 甘油二酯(DAG)也可以直接激活 TRP 通道, 这种方式我们称为受体操纵性的  $\text{Ca}^{2+}$ 内流(ROCE)<sup>[15]</sup>。值得我们注意的是, TRPC3/6/7 能够特定的被 DAG 所激活。TRPC3 通道是 TRP 通道家族相对研究相对较多的一个通道, 正如我们前面所讲述的是 该通道是由 6 个跨膜域组成, 蛋白质的 C 端富含脯氨酸的序列, 能够与钙调蛋白及肌醇三磷酸(IP3)相衔接, N 末端和 C 末端的连接蛋白的重复域都能够形成卷曲螺旋的结构域, 与它的通道功能及结合配体调节通道的功能有关。TRPC3 通道电流也是一种非选择性阳离子通道电流, 它的电流-电压关系主要表现为外向整流。反转电位在 0 ~ -20mV 左右。

众所周知, 胰岛素可以控制血糖水平和调节糖代谢, 此外它还介导了广泛的生物学反应, 如脂代谢、蛋白质合成、激活基因的信号传导、调节细胞生长和分化、离子通道的功能调节及各种类型的细胞信号传导等<sup>[16]</sup>。在不同的细胞, 胰岛素能够产生多种不同的效应。如在心脏, 胰岛素与心肌的能量代谢、收缩、蛋白质表达、糖尿病性心肌肥厚、心肌病, 以及离子传导机制等密切相关<sup>[17]</sup>。另有相关的研究发现胰岛素能够引发TRPC3蛋白的细胞膜转位,而糖尿病小鼠TRPC3蛋白的膜转位显著下降; 在胰岛素抵抗糖尿病小鼠的心肌细胞中, TRPC3蛋白的表达也是显著降低的,并且TRPC3通道离子电流也是减少的<sup>[18]</sup>。

在心肌细胞中胰岛素能够通过增加甘油二酯直接或者间接地激活TRPC3通道,例如在豚鼠和小鼠的心室肌细胞中,胰岛素能够激活TRPC3通道而产生非选择性阳离子电流<sup>[18,19]</sup>。

宋艳东等人<sup>[20]</sup>发现了胰岛素可以激活兔心室肌细胞的非选择性阳离子流, 丁怀玉等人<sup>[6]</sup>发现兔心房和肺静脉上的非选择性阳离子通道与TRPC3非常相似, 本实验将主要研究心房肌和肺静脉肌袖心肌细胞的动作电位及TRPC3类通道离子流方面的差异, 揭示肺静脉肌袖心肌细胞的电生理特性; 同时将研究胰岛素对心房肌和肺静脉肌袖心肌细胞的动作电位及TRPC3类通道离子流的影响, 以证实

PVC和LAC上存在的非选择性阳离子通道是否为TRPC3, 进一步揭示PVC的电生理特性及TRPC通道在兔肺静脉肌袖心肌细胞EAD中的作用, 探讨起源于肺静脉肌袖的阵发性房颤的机制。

厦门大学博硕士论文摘要库



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库